

**WO0160374**

**Title:**  
**USE OF PAULLONE DERIVATIVES FOR MAKING MEDICINES**

**Abstract:**

**The invention concerns the use for producing of GSK-3 beta inhibiting medicines from paullone derivatives. The invention is useful for treating pathologies involving GSK-3 beta and CDK5.**

**The invention concerns the use for producing of GSK-3 beta inhibiting medicines from paullone derivatives. The invention is useful for treating pathologies involving GSK-3 beta and CDK5.**

(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION  
EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(19) Organisation Mondiale de la Propriété  
Intellectuelle  
Bureau international



(43) Date de la publication internationale  
23 août 2001 (23.08.2001)

PCT

(10) Numéro de publication internationale  
**WO 01/60374 A1**

(51) Classification internationale des brevets<sup>7</sup> :  
A61K 31/55, A61P 35/00, 9/00, 25/28, C07D  
487/04 // (C07D 487/04, 223:00, 209:00)

(74) Mandataires : PEAUCELLE, Chantal etc.; Cabinet Ar-  
mengaud Aine, 3, Avenue Bugeaud, F-75116 Paris (FR).

(21) Numéro de la demande internationale :  
PCT/FR01/00455

(81) États désignés (national) : AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ,  
BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE,  
DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU,  
ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS,  
LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO,  
NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR,  
TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

(22) Date de dépôt international :  
15 février 2001 (15.02.2001)

(25) Langue de dépôt : français

(84) États désignés (régional) : brevet ARIPO (GH, GM, KE,  
LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), brevet eurasien  
(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet européen  
(AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU,  
MC, NL, PT, SE, TR), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI,  
CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(26) Langue de publication : français

(30) Données relatives à la priorité :  
00/01862 15 février 2000 (15.02.2000) FR

(71) Déposant (pour tous les États désignés sauf US) :  
CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCI-  
ENTIFIQUE (C.N.R.S.) [FR/FR]; 3, rue Michel-Ange,  
F-75794 Paris Cedex 16 (FR).

Publiée :  
— avec rapport de recherche internationale  
— avant l'expiration du délai prévu pour la modification des  
revendications, sera republiée si des modifications sont  
reçues

(72) Inventeurs; et

(75) Inventeurs/Déposants (pour US seulement) : MEIJER,  
Laurent [FR/FR]; 16, rue de Bir Hakeim, F-29680 Roscoff  
(FR). KUNICK, Conrad [DE/DE]; 48a, Stremelkamp,  
21149 Hamburg (DE).

En ce qui concerne les codes à deux lettres et autres abrégia-  
tions, se référer aux "Notes explicatives relatives aux codes et  
abréviations" figurant au début de chaque numéro ordinaire de  
la Gazette du PCT.

(54) Title: USE OF PAULLONE DERIVATIVES FOR MAKING MEDICINES

(54) Titre : UTILISATION DE DERIVES DE PAULLONES POUR LA FABRICATION DE MEDICAMENTS

(57) Abstract: The invention concerns the use for producing of GSK-3 $\beta$  inhibiting medicines from paullone derivatives. The inven-  
tion is useful for treating pathologies involving GSK-3 $\beta$  and CDK5.

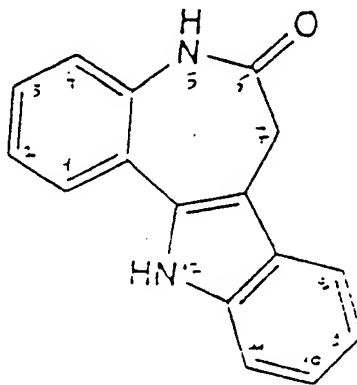
(57) Abrégé : L'invention vise l'utilisation pour la fabrication de médicaments inhibiteurs de la GSK-3 $\beta$  de dérivés de paullones.  
Application pour le traitement de pathologies impliquant GSK-3 $\beta$  et CDK5.

Utilisation de dérivés de paullones pour la fabrication de médicaments.

L'invention a pour objet une nouvelle utilisation en thérapeutique de dérivés de paullones.

Les paullones constituent une famille appartenant aux benzazépinones.

Le chef de file de cette famille, appelé paullone, répond à la formule suivante :



Dans Journal of Medicinal Chemistry, 1999, vol 42, n°15, pages 2909-2919, les auteurs, dont l'un est co-inventeur de la présente demande, rapportent les propriétés inhibitrices de kinases cyclines dépendantes (CDKs en abrégé) présentées par des paullones, et leur activité anti-tumorale *in vitro*.

Les CDKS jouent un rôle majeur notamment dans la régulation du cycle cellulaire, en contrôlant la transmission entre les étapes successives du cycle cellulaire. Leur activité est régulée par de multiples mécanismes et notamment par la liaison aux cyclines qui

varie durant le cycle cellulaire. La liaison à des inhibiteurs de CDKs entraîne une désactivation des CDKs.

Des dérivés de paullone substitués sur différentes positions, et en particulier en position 9, se sont révélés, comme rapporté dans l'article ci-dessus, 5 fortement inhibiteurs de CDK1/-cycline B. Ainsi, la 9 - nitro-7,12-dihydroindolo[3,2-d] [1]-benzazépin-6 (5H)-one, appelée alsterpaullone, présente une  $IC_{50}$  de  $0,035 \mu M$  et une activité anti-tumorale *in vitro* d'un ordre de grandeur 10 supérieur à 1 ( $\log IC_{50}$ , moyenne du point du milieu du graphe =  $-6,4M$ ).

Ces propriétés inhibitrices de CDKs, qui entraînent un arrêt du cycle cellulaire, confèrent à ces dérivés de paullones un intérêt pour le traitement de 15 pathologies liées à la perte du contrôle de la prolifération comme les cancers, le psoriasis, les maladies cardio-vasculaires, les maladies infectieuses, la néphrologie, les maladies neurodégénératives et les infections virales.

20 De manière surprenante, les inventeurs ont à présent mis en évidence que certains de ces dérivés de paullones exerçaient un effet inhibiteur sur une autre cible enzymatique, constituée par la glycogène synthase kinase-3 $\beta$  ou GSK-3 $\beta$  en abrégé, ainsi que le cas échéant sur 25 les CDKs, et notamment la CDK5/p25.

La GSK-3 $\beta$  est un élément essentiel de la voie de signaux WNT. Elle est impliquée dans de multiples processus physiologiques: régulation du cycle cellulaire par contrôle de taux de cycline D1 et de  $\beta$ -caténine, formation dorso-ventrale durant le développement, action de l'insuline sur 30

la synthèse de glycogène, excroissance axonale, neurotoxicité de HIV-1 à médiation par Tat, et autres.

De plus, on sait que la GSK-3 $\beta$  et la CDK5 sont responsables pour une bonne part de l'hyperphosphorylation anormale de la protéine tau liant les microtubules comme observé dans les filaments appariés en hélice dans la maladie d'Alzheimer et autres "taupathies" neurodégénératives.

On mesure également l'intérêt de pouvoir disposer de dérivés inhibiteurs de l'activité de GSK-3 $\beta$  pour favoriser la division cellulaire.

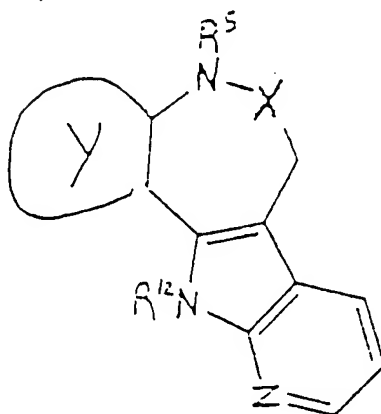
Or, les seuls inhibiteurs de la GSK-3 $\beta$  divulgués à ce jour sont constitués par le lithium et certains dérivés de purine.

La sélectivité du lithium n'a pas été rapportée, mais étant donné la nature atomique du produit, il est vraisemblable qu'elle doit être très faible. De plus, le lithium n'agit qu'à des doses considérables (IC<sub>50</sub> autour de 10 mM).

Il en est de même avec les dérivés de purine décrits dans la demande WO 98/16528, qui sont peu sélectifs et dont les IC<sub>50</sub> sont autour de 10  $\mu$ M.

L'invention apporte une solution à ces problèmes avec l'utilisation, pour la fabrication de médicaments inhibiteurs de GSK-3 $\beta$  et le cas échéant de CDKs, de paullones de grande efficacité, présentant, vis-à-vis de GSK-3 $\beta$ , des IC<sub>50</sub> inférieures à 10  $\mu$ M, et même pour un bon nombre d'entre elles inférieures à 5  $\mu$ M, voire à 1  $\mu$ M. Certains de ces composés présentent même des IC<sub>50</sub> inférieures à 50 nM et atteignant pour certains des valeurs inférieures à 10 nM.

Conformément à l'invention, pour la fabrication desdits médicaments à effet inhibiteur notamment de GSK-3 $\beta$ , on utilise des dérivés de paullone répondant à la formule générale (I) :



(I)

dans laquelle

- X représente un groupe C = O, C-S-CH<sub>3</sub>, C-S, -C-NHOH;
- Z représente C ou N ;
- Y représente, avec le cycle adjacent, un résidu phényle ou thiazolyle ;

le ou les cycles constituant ces dérivés étant le cas échéant substitués par un ou plusieurs : atomes d'halogène, groupes hydroxy, alkylènehydroxy, alcynalkylènehydroxy, alcynhydroxycyclohexyle, alkyle, alkoxy, alkylènealkoxy, alkylènecyano, le groupe alkylène étant saturé ou insaturé, ces radicaux étant à chaîne droite ou ramifiée, en C1 à C18, ladite chaîne étant le cas échéant substituée par un ou plusieurs groupes hydroxy ou amino ; un ou plusieurs groupes trifluorométhyle ; -COM ; -COOM ; ou -CH<sub>2</sub>COOM (avec M représentant un atome d'hydrogène, un groupe alkyle en C1 à C18, à chaîne droite

ou ramifiée, substituée le cas échéant par un ou plusieurs groupes hydroxy et/ou amino) ; nitroso; nitro ; ou cyano ;

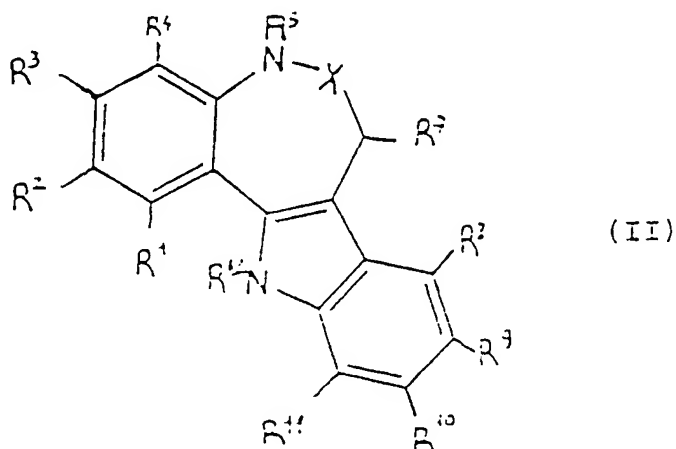
-  $R^5$  représente un atome d'hydrogène ou un groupe alkyle en  $C_1$  à  $C_5$ ,

-  $R^{12}$  représente un atome d'hydrogène, ou un groupe  $-C-CO_2-(CH_2)_3$ ,

et les sels de ces dérivés physiologiquement acceptables.

Dans une famille préférée, Y représente, avec le cycle adjacent, un résidu phényle, et Z =C. Cette famille

répond à la formule générale (II) :



dans laquelle,

- X,  $R^5$  et  $R^{12}$  sont tels que définis ci-dessus, et

-  $R^1$  à  $R^4$ ,  $R^7$  à  $R^{11}$ , identiques ou différents,

représentent un atome d'hydrogène, d'halogène (F, Cl, Br, I), un groupe hydroxy, alkylènehydroxy,

alcynealkylènehydroxy, alcynehydroxycyclohexyle, alkyle, alkoxy, alkylènealkoxy, alkylènecyano, ces radicaux étant à

chaîne droite ou ramifiée, en  $C_1$  à  $C_{18}$ , le groupe alkylène étant saturé ou insaturé, ladite chaîne étant le cas

échéant substituée par un ou plusieurs groupes hydroxy ou amino ; un groupe trifluorométhyle; un groupe  $-COM$ ;  $-COOM$ ;

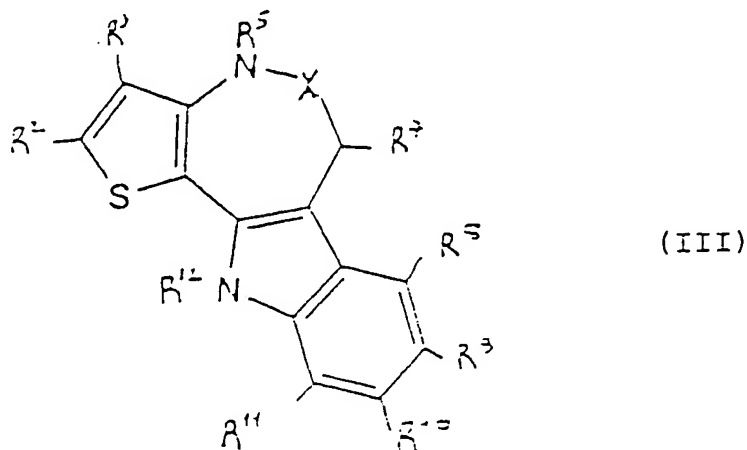
ou  $-CH_2COOM$ , (avec M représentant un atome d'hydrogène, un

groupe alkyle en C1 à C18, à chaîne droite ou ramifiée, substituée le cas échéant par un ou plusieurs groupes hydroxy et/ou amino) ; un groupe nitroso; un groupe nitro ; ou un groupe cyano ;

et les sels physiologiquement acceptables de ces dérivés.

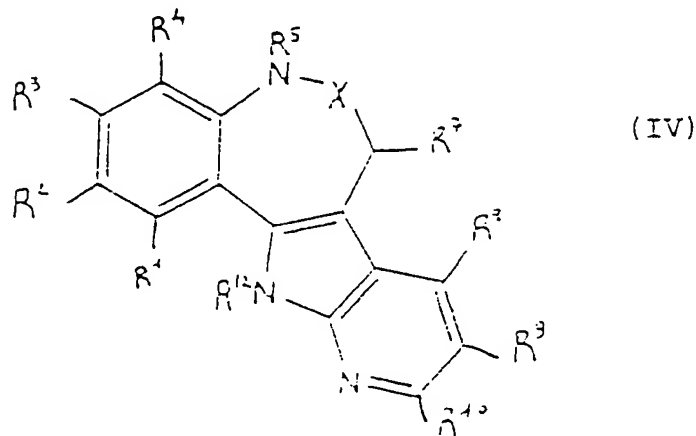
Dans une autre famille préférée, Y représente, avec le cycle adjacent, un résidu thiazolylo et Z = C.

Cette famille répond à la formule générale (III) :



dans laquelle les substituants présentent les significations données ci-dessus en rapport avec la formule (II).

Dans encore une autre famille, Y forme avec le cycle adjacent un groupe phényle et Z = N. Cette famille répond à la formule (IV) :





dans laquelle les substituants présentent les significations données en rapport avec la formule (II).

Un groupe de dérivés de paullones préférés dans ces différentes familles correspond au cas où X représente  
5 C = O.

Dans un autre groupe X représente C-S-CH<sub>3</sub> ou C-S.

Dans encore un autre groupe X représente -C-NHOH.

De manière générale, les dérivés de l'invention présentent avantageusement une IC<sub>50</sub> vis-à-vis de GSK-3β  
10 inférieure à 10 μM et pour bon nombre d'entre eux à 1 μM, des IC<sub>50</sub> inférieures à 100 nM et même à 10 nM pouvant être obtenues.

Des paullones particulièrement préférées de ces groupes appartiennent aux familles de formule (II) ou de  
15 formule (III) avec R<sup>9</sup> choisi parmi -NO<sub>2</sub>, -CN, -Cl, -Br, -CF<sub>3</sub>, alkyle en C<sub>1</sub> à C<sub>5</sub>, en particulier méthyle, ou un atome d'hydrogène, R<sup>2</sup> et/ou R<sup>3</sup> choisis parmi alkoxy (en C<sub>1</sub> à C<sub>3</sub> pour le radical alkyle) et notamment méthoxy, alkylènecyano, vinylalkoxy, ou propylène, les autres  
20 substituants étant de l'hydrogène.

L'invention vise en particulier l'utilisation pour la fabrication de médicaments sélectivement inhibiteurs de GSK-3β, de CDK1 et de CDK5, de dérivés de paullone de formule (II) dans laquelle X = CO, R<sup>9</sup> est  
25 choisi parmi -NO<sub>2</sub>, -CN, -Br, -Cl, -CF<sub>3</sub>, H, et R<sup>2</sup> et/ou R<sup>3</sup> représentent H, alkoxy en C<sub>1</sub>-C<sub>5</sub>, notamment méthoxy, alkylènecyano, notamment méthylènecyano, les autres substituants étant de l'hydrogène.

L'invention vise tout spécialement l'utilisation  
30 de paullones de formule (II) dans laquelle X = CO,

$R^9$  représenté  $-\text{NO}_2$ ,  $-\text{CN}$ ,  $-\text{Br}$ ,  $-\text{Cl}$  ou  $-\text{CF}_3$ , les autres substituants représentant de l'hydrogène.

L'invention vise encore tout spécialement l'utilisation de paullones de formule (II) dans laquelle  
5  $X=\text{CO}$ ,  $R^9$  représente les significations ci-dessus et  $R^2$  et  $R^3$  représentent tous deux un groupe alkoxy en  $\text{C}_1$  à  $\text{C}_5$ , notamment méthoxy, ou  $R^2$  représente un groupe alkylènecyano, notamment éthylènecyano.

L'invention vise également en particulier  
10 l'utilisation pour la fabrication de médicaments sélectivement inhibiteurs de GSK-3 $\beta$ , de paullones de formule générale (II) dans laquelle  $X = \text{SCH}_3$  et  $R^9$  est tel que défini ci-dessus et représente en particulier un atome d'halogène, notamment de brome.

15 Selon un autre mode de réalisation de l'invention, on utilise pour la fabrication de médicaments inhibiteurs de GSK-3 $\beta$ , CDK1 et CDK5, avec une sélectivité plus grande vis-à-vis de GSK-3 $\beta$  et de CDK1, des dérivés de paullones de formule (III) dans laquelle  $R^9$  est tel que  
20 défini ci-dessus dans ses significations préférées, les autres substituants représentant un atome d'hydrogène.

On notera que la 9-cyano-2,3-diméthoxypaullone est un produit nouveau et à ce titre entre dans le champ de  
25 l'invention.

L'invention permet donc de disposer de médicaments ayant la sélectivité requise pour une application donnée.

30 Les médicaments fabriqués conformément à l'invention en utilisant ces dérivés de paullones sont tout

spécialement appropriés pour le traitement des pathologies dans lesquelles la GSK-3 $\beta$  est impliquée.

Il en est ainsi notamment en endocrinologie, par exemple, dans les diabètes, où les inhibiteurs de GSK-3 $\beta$  sont utilisables comme insulino-mimétiques. On rappelle que l'insuline agit par une cascade d'événements biochimiques conduisant à une inhibition de la GSK-3 $\beta$  et que cette inhibition est responsable de la réponse des cellules à l'insuline.

De même, ces médicaments présentent un grand intérêt pour le traitement de maladies neurodégénératives, comme la maladie d'Alzheimer. L'hyperphosphorylation de la protéine tau provoquée par CDK5 et GSK-3 $\beta$  peut être en effet inhibée par les dérivés de paullones. En administrant les médicaments fabriqués selon l'invention, il est alors possible, grâce à leur effet inhibiteur à la fois de CDK5 et de GSK-3 $\beta$ , d'empêcher l'hyperphosphorylation de la protéine tau chez les malades d'Alzheimer et de lutter contre la neurodégénérescence et l'ischémie.

Ces médicaments trouvent également une application de grand intérêt pour le traitement de maladies maniaco-dépressives.

On citera en outre leur utilisation pour le traitement de cancers où leur effet inhibiteur à la fois de GSK-3 $\beta$  et de CDK1/2/5, qui se traduit par l'apoptose de la cellule tumorale, est avantageusement mis à profit.

Ces médicaments s'avèrent également efficaces pour le traitement de maladies provoquées par des parasites unicellulaires comme la malaria, les trypanosomes, les leishmanias, les toxoplasmes, les pneumocystis et autres, ou par des parasites pluricellulaires, comme les

champignons et les vers. Les génomes de ces parasites contiennent en effet des gènes GSK3 homologues, mais différentes de GSK-3 humain.

5 Ils sont également utilisables dans la sphère cardio-vasculaire pour traiter ou prévenir notamment, l'athérosclérose, la resténose ou l'angiogénèse, en modifiant l'équilibre entre la prolifération et l'apoptose, et en contrôlant les taux de  $\beta$ -caténine.

10 On les utilisera également avec avantage pour le traitement des maladies infectieuses, comme par exemple le SIDA.

Lors de l'élaboration des médicaments, les principes actifs, utilisés en quantités thérapeutiquement efficaces, sont mélangés avec les véhicules  
15 pharmaceutiquement acceptables pour le mode d'administration choisi.

Ainsi pour une administration par voie orale, les médicaments sont préparés sous forme de gélules, comprimés, dragées, capsules, pilules, gouttes et analogues. De tels  
20 médicaments peuvent renfermer de 1 à 100 mg de principe actif par unité.

Pour l'administration par voie injectable (intraveineuse, sous-cutanée, intramusculaire), les médicaments se présentent sous forme de solutions stériles ou  
25 stérilisables. Il peut s'agir également de suspensions ou d'émulsions. Les doses par unité de prise peuvent varier de 1 à 50 mg de principe actif. La posologie quotidienne est choisie de manière à obtenir une concentration finale d'au plus 100  $\mu$ M en dérivé de paullone dans le sang du patient  
30 traité.

A titre d'indicatif, la posologie utilisable chez l'homme correspond aux doses suivantes : ainsi on administre par exemple au patient en une ou plusieurs prises

10 à 50 mg/jour pour le traitement de tumeurs ou de parasitoses.

Afin d'illustrer l'invention, sans toutefois en limiter sa portée, on rapporte dans les exemples qui suivent  
5 d'autres caractéristiques et avantages.

Dans ces exemples, il serait fait référence aux figures 1 à 6, qui représentent respectivement,

- les figures 1A et 1B, l'activité inhibitrice vis-à-vis de CDKs, CDK1/CDK2, et de GSK-3 de l'alsterpaullone (fig. 1A) et de la kenpaullone (fig. 1B) en fonction de la  
10 concentration de ces paullones,

- la figure 2, les formules de paullones selon l'invention,

- les figures 3A à 3C, les  $IC_{50}$  de paullones selon l'invention vis-à-vis de l'une des protéines kinases GSK3, CDK1/cycline B, CDK5/p25 en fonction de leurs  $IC_{50}$  vis-à-vis  
15 des 2 autres protéines kinases,

- la figure 4, les courbes montrant l'inhibition de GSK-3 $\beta$  par l'alsterpaullone pour compétition avec l'ATP,

- la figure 5, l'effet inhibiteur de l'alsterpaullone de la phosphorylation de tau par GSK-3 $\beta$  *in vitro* et *in vivo*, et  
20

- la figure 6, l'inhibition de la phosphorylation de DARPP-32 par CDK5 sur Thr75 *in vivo* par l'alsterpaullone.

#### 25 • Caractérisation des paullones

Les analyses élémentaires ont été effectuées à l'aide d'un appareil d'analyse élémentaire de CHN Perkin-Elmer 2400. Les spectres de RNN<sup>1</sup>H ont été enregistrés à 400 MHz, de RMN<sup>13</sup>C à 100 MHz sur un appareil Bruker AMX 400, avec  
30 comme référence interne du tétraméthylsilane.

Les synthèses des composés du tableau 2 ont été réalisées selon les méthodes décrites dans J. of Medicinal Chemistry indiqué plus haut. La synthèse des 2-iodopaullone, 2-bromo-9-nitropaullone, 2,3 diméthoxy-9-nitropaullone, 9-cyano-2,3, diméthoxy paullone, 7-bromo-5-

(4-nitrophénylhydrazono)-4,5-dihydro-1-H-[1]benzazépin-2(3H)-one, 7,8-diméthoxy-5-(4-nitrophénylhydrazono)-4,5-dihydro-1H-[1]benzazépin-2(3H)-one, est décrite dans les exemples 1 à 6.

. Tampons

Les tampons utilisés ont les compositions suivantes:

Tampon d'homogénéisation: - 60 mM de  $\beta$ -glycérophosphate, 15 mM de p-nitrophénylphosphate, 25 mM de Mops (pH 7,2), 15 mM  
5 d'EGTA, 15 mM de  $MgCl_2$ , 1 mM de DTT, 1 mM vanadate de sodium, 1 mM de NaF, 1 mM de phénylphosphate, 10  $\mu g$  de leupeptine/ml, 10  $\mu g$  d'aprotinine/ml, 10  $\mu g$  d'inhibiteur de trypsine de soja/ml et 100  $\mu M$  de benzamidine.

Tampon A : 10 mM de  $MgCl_2$ , 1 mM de EGTA, 1 mM de DTT, 25 mM  
10 de Tris-HCl pH 7,5, 50  $\mu g$  d'héparine/ml.

Tampon C : tampon d'homogénéisation, mais renfermant 5 mM d'EGTA, et dépourvu de NaF et d'inhibiteurs de protéase.

Tris-tampon salin de Tween-20 (TBST) : 50 mM de Tris pH 7,4, 150 mM de NaCl, 0,1% de Tween-20<sup>3</sup>.

15 Tampon de lyse hypotonique (HLB) : 50 mM de Tris-HCl pH 7,4, 120 mM de NaCl, 10% de glycérol, 1% de Nonidet-P40, 5 mM de DTT, 1 mM d'EGTA, 20 mM de NaF, 1 mM d'orthovanadate, 5  $\mu M$  de microcystine, 100  $\mu g/ml$  de chacun des produits  
suivants : leupeptine, aprotinine, pepstatine.

20 . Préparations de kinases et déterminations des activités

Les activités des kinases ont été déterminées dans le tampon A ou C (à moins d'indications contraires), à 30°C, à une concentration finale en ATP de 15  $\mu M$ . Les valeurs des  
25 essais à blanc ont été soustraites et les activités calculées en pmoles de phosphate incorporé pour une incubation de 10 min. Les valeurs des activités sont

généralement exprimées en % de l'activité maximale, c'est-à-dire, en l'absence d'inhibiteurs.

Des essais témoins ont été réalisés à l'aide de dilutions appropriées de Me<sub>2</sub>SO. Dans quelques cas, comme  
5 indiqué ci-après, la phosphorylation des substrats est déterminée par autoradiographie après SDS-PAGE.

La GSK-3 $\beta$  utilisée est soit l'enzyme purifiée à partir du muscle de lapin ou exprimée et purifiée à partir de cellules d'insecte Sf9 (Hughes et al, 1992, Eur. J.  
10 Biochem., 203 : 305,311). Les déterminations ont été effectuées avec une dilution à 1/100 dans 1 mg de BSA/ml de DTT 10 mM, avec 5  $\mu$ l de GS-1 40  $\mu$ M comme substrat, dans le tampon A, en présence de 15  $\mu$ M [ $\gamma$ <sup>32</sup>P] ATP (3000 Ci/moles ; 1 mCi/ml) dans un volume final de 30  $\mu$ l. Après 30 minutes  
15 d'incubation à 30°C, des aliquotes de 25  $\mu$ l de surnageant ont été appliqués sur des bandes de papier de phosphocellulose Whatman P81, de 2,5 x 3 cm, et 20 secondes plus tard, les filtres ont été lavés 5 fois (pendant au moins 5 min. à chaque fois), dans une solution de 10 ml  
20 d'acide phosphorique/1 d'eau. Les filtres humides ont fait l'objet de comptage en présence de 1 ml de fluide de scintillation ACS (Amersham).

La CDK1/cycline B utilisée a été extraite à l'aide d'un tampon d'homogénéisation à partir d'ovocytes  
25 d'étoiles de mer (*Marthasterias glacialis*) et purifiée par chromatographie d'affinité sur des billes de p9<sup>CXShs1</sup>-Sépharose à partir desquelles le produit a été élué par du p9<sup>CXShs1</sup> libre, comme décrit par Meijer et al., 1997, (Methods in Enzymology, vol 283 : 113-128), et Borgne et  
30 al., 1999, J. Biol. Chem. 274 : 11977-11986.

L'activité kinase a été déterminée dans le tampon C, avec 1 mg d'histone H1/ml, en présence de 15  $\mu$ M de [ $\gamma$ <sup>32</sup>P] ATP ((3000 Ci/mmol ; 1 mCi/ml) dans un volume final de 30  $\mu$ l.

5           Après 10 minutes d'incubation à 30°C, des aliquotes de 25  $\mu$ l de surnageant ont été déposés sur des papiers de phosphocellulose P81 et traités comme décrit ci-dessus.

10           La CDK5/p35 a été reconstituée en mélangeant des quantités égales de CDK5 et de p35 de mammifère recombinantes, exprimées dans *E.coli* sous forme de protéine de fusion GST (Glutathione-S-transférase) et purifiées par chromatographie d'affinité sur glutathione-agarose. L'activité enzymatique du complexe a été déterminée dans le  
15   tampon C comme décrit pour CDK1/cycline B.

. Phosphorylation de tau *in vitro* et *in vivo*

20           La phosphorylation de tau *in vitro* a été effectuée en utilisant de la GSK-3 $\beta$  purifiée et la protéine tau-32 humaine recombinante en tant que substrat. Après 30 minutes d'incubation en présence de différentes concentrations d'alsterpaullone, dans les conditions d'étude de la GSK-3 $\beta$  décrite ci-dessus, la réaction de la kinase a été arrêtée par addition de tampon Laemmli. La protéine tau a été résolue en SDS-PAGE à 10% et son taux de  
25   phosphorylation visualisé par autoradiographie.

30           Cellules et virus : on a cultivé les cellules Sf9 (Invitrogen, San Diego, CA) à 27°C dans un milieu de Grace de culture en monocouche (Gibco BRL, Gaithersburg, MD), supplémenté avec 10% de sérum bovin foetal et 50  $\mu$ g de gentamycine/ml et 2,5  $\mu$ g d'amphotéricine/ml. BaculoGold a



été obtenu auprès de PharMingen (San Diego, CA), et pVL1392 de InVitrogen.

La transfection de tau : on a excisé, à partir d'un vecteur d'expression bactérien pNG2 (Biernat et al., 1993, Neuron 11 : 153-163) et le gène codant pour htau23, l'isoforme tau humain le plus court, avec XbaI et BamHI. Le gène a été inséré dans le vecteur de transfert de baculovirus pVL1392 découpé avec les mêmes endonucléases. Le système BaculoGold a été utilisé pour la construction du vecteur contenant le baculovirus tau. L'ADN de BaculoGold est un type modifié de baculovirus contenant une délétion létale.

La co-transfection de l'ADN de BaculoGold avec un vecteur de transfert de baculovirus complément permet de récupérer la délétion létale de cet ADN viral et de reconstituer des particules de virus viables portant la séquence codant pour htau23.

L'ADN plasmidique utilisé pour les transfections a été purifié en utilisant des cartouches de QIAGEN (Hilden, Allemagne).

Les cellules Sf9 cultivées en monocouches ( $2 \times 10^5$  cellules dans un récipient de culture cellulaire de 60 mm) ont été co-transfectées avec de l'ADN de baculovirus (0,5  $\mu$ g d'ADN de BaculoGold) et avec les dérivés de pVL1392 (2  $\mu$ g) en utilisant la méthode de co-précipitation au phosphate de calcium. La présence de protéine recombinante a été examinée dans les cellules infectées 5 jours après l'infection par SDS-PAGE et Western blot.

Traitement de cellules Sf9 avec des inhibiteurs  
de kinases

Pour déterminer les effets des inhibiteurs de l'aminopurvalanol et l'alsterpaulone sur la phosphorylation de tau, les cellules Sf9 infectées par le baculovirus exprimant htau23 ont été traitées 36 heures après l'infection, (lorsque les cellules ont déjà exprimé des niveaux de tau suffisants pour le développement des processus cellulaires) avec 20  $\mu$ M d'inhibiteurs pendant 3 heures avant d'être recueillies.

Western blot de tau :

Les cellules Sf9 ont été infectées avec un virus recombinant à une MOI de 1 à 5.

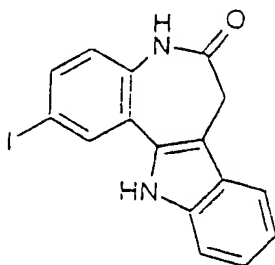
Les lysats cellulaires ont été préparés dans le tampon de lyse hypotonique (HLB).

Après 15 minutes de centrifugation à 16000 g, le surnageant a été récupéré et sa concentration en NaCl augmentée jusqu'à 500 mM. Le surnageant a été ensuite soumis à ébullition pendant 10 min. et recentrifugé à 16000 g pendant 15 min. Les protéines (3  $\mu$ g) ont été résolues par SDS-PAGE, transférées sur une membrane de PVDF et étudiées avec un Western blot avec les anticorps suivants : AT-8 (1:2000), AT-180 (1:1000), AT-100 (1:500), PHF-1 (1:600) et l'anticorps polyclonal anti-tau K9JA. L'immunocoloration a été visualisée en utilisant un système de chimioluminescence ECL (Amersham, Braunschweig, Allemagne).

Inhibition in situ de CDK5 dans le striatum

On prépare des coupes striatales de cerveau de souris adulte selon la méthodologie standard. En suivant  
5 l'équilibre dans un tampon de bicarbonate de Krebs oxygéné avec une aération continue (95%O<sub>2</sub>/5%CO<sub>2</sub>), on traite les coupes avec différentes concentrations d'alsterpaullone, ou avec 10µm de roscovitine pendant 60 min., ou on les laisse dans le tampon de bicarbonate de Krebs pendant la même  
10 durée. Les coupes homogénéisées par sonication dans 1% de SDS à ébullition et 50mM de NaF. On détermine les concentrations en protéines par la méthode BCA en utilisant une courbe standard de BSA. Des quantités égales de protéines (80 µg) sont soumises à une SDS-PAGE en utilisant  
15 un gel à 15% d'acrylamide, transféré par électrophorèse sur une membrane de nitrocellulose et soumis à un immunoblot avec un anticorps de phosphorylation spécifique qui détecte sélectivement DARPP-32 phosphorylé sur Thr75.

Exemple 1 : 2-Iodo-7,12-dihydro-indolo [3,2-d] [1] benzazépine-6(5H)-one (2-iodopaullone)  
20

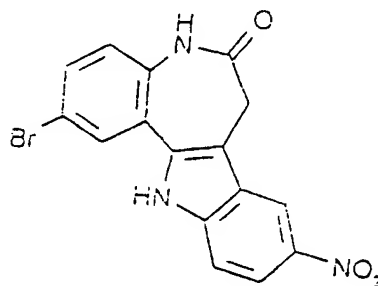


25

Une bouillie de phénylhydrazine (162 mg, 1,5 mmol) et de 7-iodo-1H-[1] benzazépine-2,5 (3H, 4H)-dione (301 mg, 1 mmol) dans de l'acide acétique glacial (10 mL) est soumise à  
30 agitation pendant 1 h à 70°C. On ajoute de l'acide sulfurique concentré (0,1 mL) et on continue l'agitation

1 h à 70°C. Après refroidissement à la température ambiante, le mélange est versé dans une solution aqueuse d'acétate de sodium à 5%. Le précipité est éliminé par filtration, lavé avec de l'eau et cristallisé à partir d'éthanol. On obtient 57% de cristaux beige, PF 303°C (dec.) ; ir (KBr) : 3270 (NH), 1640 (C=O) ; <sup>1</sup>H-RMN (DMSO-d<sub>6</sub>, 400 MHz) : δ (ppm) = 3,52 (s, 2H, CH<sub>2</sub>), 7,04-7,10 (3, 2H), 7,19 ("t", 7,6 Hz, 1H), 7,43 (d, 8,2 Hz, 1 H), 7,66-7,69 (m, 2H), 8,07 (d, 1,5 Hz, 1H), 10,17 (s, 1H, lactame NH), 11,66 (s, 1H, indole NH) ; C<sub>15</sub>H<sub>11</sub>IN<sub>2</sub>O (374,18) ; Calc. C 51,4, H 3,0, N 7,5 ; trouvé C 51,0, H 3,3, N 7,2.

Exemple 2 : 2-Bromo-7,12-dihydro-9-nitro-indolo [3,2-d] [1] benzazépine-6(5H)-one (2-bromo-9-nitropauillone)



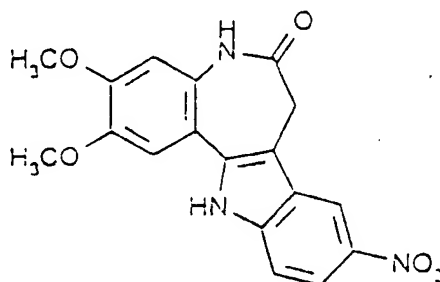
20

La 7-Bromo-5-(4-nitrophénylhydrazono)-4,5-dihydro-1H-[1] benzazépine-2(3H)-one (389 mg, 1 mmol) est mise à reflux dans du diphényl-éther (20 mL) pendant 2 h sous azote. Après refroidissement à température ambiante, on ajoute de l'hexane (50 mL). Le précipité est filtré, lavé avec de l'hexane et cristallisé à partir d'éthanol/toluène. On obtient des cristaux jaune foncé (35%), PF > 330°C ; ir (KBr) : 3310 (NH), 1670 (C=O) ; <sup>1</sup>H-RMN (DMSO-d<sub>6</sub>, 400 MHz) : δ (ppm) = 3,69 (s, 2H, CH<sub>2</sub>), 7,23 (d, 1H, 8,6 Hz), 7,59-7,64 (m, 2H), 7,96 (d, 1H, 2,0 Hz), 8,09 (dd, 1H, 9,1/2,0 Hz),

30

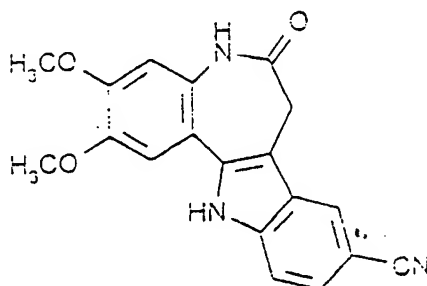
8,77 (d, 1H, 1,5 Hz), 10,32 (s, 1H, lactame NH), 12,46 (s, 1H, indole NH) ;  $C_{16}H_{10}BrN_3O_3$  (372,19) ; Calc. C 51,6, H 2,7, N 11,2, Br 21,5 ; trouvé C 51,5, H 3,0, N 10,8, Br 21,3.

5 Exemple 3 : 2,3-Diméthoxy-7,12-dihydro-9-nitro-indolo[3,2-d] [1] benzazépine-6(5H)-one (2,3-diméthoxy-9-nitropauillone)



10 La 7,8-Diméthoxy-5-(4-nitrophenylhydrazono)-4,5-dihydro-1H-[1] benzazépine-2(3H)-one (370 mg, 1 mmol) est mise à reflux dans du diphényl-éther (20 mL) pendant 2 h sous azote. Après refroidissement à température ambiante, on  
15 ajoute de l'hexane (50 mL). Le précipité est filtré, lavé avec de l'hexane et cristallisé à partir d'éthanol/toluène. On obtient des cristaux jaune foncé (63%), PF > 330°C ; ir (KBr) : 3340 (NH), 1660 (C=O) ;  $^1H$ -RMN (DMSO- $d_6$ , 400 MHz) :  $\delta$  (ppm) = 3,58 (s, 2H,  $CH_2$ ), 3,81 (s, 3H,  $OCH_3$ ), 3,88 (s,  
20 3H,  $OCH_3$ ), 6,90 (s, 1H), 7,31 (s, 1H), 7,31 (s, 1H), 7,59 (d, 1H, 9,2 Hz), 8,05 (dd, 1H, 8,9/2,3 Hz), 8,69 (d, 1H, 2,0 Hz), 9,94 (s, 1H, lactame NH), 12,32 (s, 1H, indole NH) ;  $C_{18}H_{15}N_3O_5$  (353,35) ; Calc. C 51,2, H 4,3, N 11,9 ; trouvé C 50,9, H 4,4, N 11,8.

Exemple 4 : 2,3-Diméthoxy-6-oxo-5,6,7,12-tetrahydro-indolo  
[3,2-d] [1]benzazépine-9-carbonitrile (9-cyano-2,3-  
diméthoxypaullone)



La 9-Bromo-2,3-diméthoxy-7,12-dihydro-indolo[3,2-d] [1] benzazépine-6(5H)-one (387 mg, 1 mmol) et du cyanure de cuivre (I) (179 mg, 2 mmol) sont mis à reflux pendant 2 h dans de la N-méthyl-2-pyrrolidone (10 mL). Après  
 15 refroidissement à température ambiante, on ajoute de l'eau (10 mL) et le mélange réactionnel est soumis à agitation pendant 15 min. Le précipité est éliminé par filtration et soumis à agitation pendant encore 15 min. dans un mélange d'eau (10 mL) et d'éthylène diamine (2,5 mL). Le précipité  
 20 est éliminé par filtration, lavé avec une solution aqueuse à 10% de cyanure et cristallisé à partir d'éthanol/toluène. On obtient des cristaux incolores (40%), PF > 330°C ; ir (KBr) : 3300/3200 (NH), 2220 (CN), 1660 (C=O) ; <sup>1</sup>H-RMN (DMSO-d<sub>6</sub>, 400 MHz) : δ (ppm) = 3,53 (s, 2H, CH<sub>2</sub>), 3,80 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>), 3,87 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>), 6,89 (s, 1H), 7,29 (s, 1H), 7,49 (s, 1H), 7,49 (dd, 1H, 8,6/1,5 Hz), 7,58 (d, 1H, 8,2 Hz), 8,27 (s, 1H), 9,89 (s, 1H, lactame NH), 12,10 (s, 1H, indole NH) ; C<sub>19</sub>H<sub>15</sub>N<sub>3</sub>O<sub>3</sub> (333,36) ; Calc. C 68,5, H 4,5, N 12,6 ; trouvé C 68,0, H 4,5, N 12,0.

Exemple 5 : 7-bromo-5-(4-nitrophénylhydrazono)-4,5-dihydro-1H-[1]benzazépin-2(3H)-one

On soumet à agitation, dans de l'acide acétique  
glacial (10 ml), pendant 1h à 70°C, de la 7-bromo-1H-  
5 [1]benzazépine-2,5(3H,4H)dione (254 mg, 1mmole), (Kunick C.  
(1991), Arch. Pharm. (Weinheim) 324, 579-581, du chlorhydrate  
de 4-nitrophénylhydrazine (284 mg, 1,5mmole), et de l'acétate  
de sodium (123 mg, 1,5 mmole).

Après refroidissement à température ambiante, le  
10 mélange est versé dans une solution aqueuse d'acétate de  
sodium 5% (20 ml). Le précipité est récupéré par filtration,  
lavé avec de l'eau, et cristallisé à partir d'éthanol. On  
obtient des cristaux jaunes, avec un rendement de 52%; PF  
300°C (déc.); IR (KBr)/3220 (NH), 1670 (C=O); RMN-<sup>1</sup>H  
15 (diméthylsulfoxyde-d<sub>6</sub>, 400 MHz) :

- δ (p.p.m.) = 2.56-2.59 and 3.02-3.06 (m, AA'XX',  
4H, CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>), 6.99 (d, 1H, 8.1 Hz), 7.33 (d, 2H, 9.2 Hz), 7.56  
(dd, 1H, 8.7/2.6 Hz), 7.75 (d, 1H, 2.0 Hz), 8.16 (d, 2H,  
9.6 Hz), 7.56 (dd, 1H, 8.7/2.6 Hz), 7.75 (d, 1H, 2.0 Hz), 8.16  
20 (d, 2H, 9.6 Hz), 9.87 (s, 1H, NH), 10.19 (s, 1H, NH) ;  
C<sub>16</sub>H<sub>13</sub>BrN<sub>4</sub>O<sub>3</sub> (389.22) ; Calcd. C 49.4, H 3.4, N 14.4, Br 20.5 ;  
Found C 49.1, H 3.4, N 14.1, Br 20.2.

Exemple 6 : 7,8-diméthoxy-5-(4-nitrophénylhydrazono)-4,5-dihydro-1H-[1]benzazépin-2(3H)-one

25 On soumet à agitation, dans de l'acide acétique  
glacial (10 ml), pendant 1h à 70°C, de la 7,8 -diméthoxy-1H-

[1]benzazépine-2,5(3h,4H)dione (235 mg, 1 mmole), (Schultz C. et al, (1999) J.Med.Chem., 42, 2909-2919), du chlorhydrate de 4-nitrophénylhydrazine (569 mg, 3 mmoles), et de l'acétate de sodium (246mg, 3 mmoles).

5           Après refroidissement à température ambiante, le mélange est versé dans une solution aqueuse d'acétate de sodium 5% (20 ml). Le précipité est récupéré par filtration, lavé avec de l'eau, et cristallisé à partir d'éthanol. On obtient des cristaux jaunes, avec un rendement de 60%; PF 10 286°C (déc.); IR (KBr)/3260 /3180(NH), 1680 (C=O); RMN-<sup>1</sup>H (diméthylsulfoxyde-d<sub>6</sub>, 400 MHz):

-  $\delta$  (p.p.m.) = 2.53-2.56 and 2.99-3.03 (m, AA'XX', 4H, CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>), 3.77 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>), 3.81 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>), 6.65 (s, 1H), 7.20 (s, 1H), 7.32 (d, 2H, 9.2 Hz), 8.13 (d, 2H, 9.2 Hz), 9.53 (s, 1H, NH), 10.06 (s, 1H, NH) ; C<sub>18</sub>H<sub>18</sub>N<sub>4</sub>O<sub>5</sub> (370.38) ; calculated. C 58.4, H 4.9, N 15.1 ; found C 57.8, H 4.9, N 14.8.

Exemple 7 : Etude de l'inhibition de GSK-3 $\beta$ , de CDK5/p35 et de CDK1/cycline B par les paullones.

20           . Alsterpaullone

L'activité de l'alsterpaullone a été étudiée sur plusieurs kinases hautement purifiées.

Les activités kinases ont été déterminées avec un substrat approprié (GSK-3 $\beta$ : GS1 peptide; CDKs : histone H1) 25 en présence de 15  $\mu$ M d'ATP et à des concentrations croissantes en alsterpaullone et kenpaullone.

L'activité est exprimée en pourcentage de l'activité maximale.



Les résultats obtenus sont donnés sur la figure 1 et dans le tableau 1. Les valeurs de  $IC_{50}$  ont été calculées à partir des courbes dose/réponse et sont exprimées en  $\mu M$ .

Tableau 1

( $< 0.01 \mu\text{M}$  ( ),  $0.01 - 0.1 \mu\text{M}$  ( ),  $0.1 - 1 \mu\text{M}$  ( ),  $1 - 10 \mu\text{M}$  ( )  $> 10 \mu\text{M}$  ( ))

Enzyme	Alsterpaullone IC <sub>50</sub> ( $\mu\text{M}$ )
CDK1/cyclin B	
CDK2/cyclin A	
CDK2/cyclin E	0.200
CDK4/cyclin D1	$> 10.000$
CDK5/p35	
GSK-3 $\alpha$	0.004
GSK-3 $\beta$	0.004
erk1	22.000
erk2	4.500
c-raf	$> 10.000$
MAPKK	$> 100.000$
c-jun N-terminal kinase	$> 10.000$
protein kinase C $\alpha$	$> 100.000$
protein kinase C $\beta 1$	$> 100.000$
protein kinase C $\beta 2$	$> 100.000$
protein kinase C $\gamma$	$> 100.000$
protein kinase C $\delta$	$> 100.000$
protein kinase C $\epsilon$	$> 100.000$
protein kinase C $\eta$	$> 100.000$
protein kinase C $\zeta$	$> 100.000$
cAMP-dependent protein kinase	7.000
cGMP-dependent protein kinase	$> 100.000$
casein kinase 1	$> 100.000$
casein kinase 2	$> 100.000$
insulin receptor tyrosine kinase	$> 100.000$

5 On constate que la plupart des kinases testées sont faiblement ou pas du tout inhibées (IC<sub>50</sub>  $> 10 \mu\text{M}$ ).

On notera qu'en plus de l'effet sur la  
 CDK1/cycline B, l'alsterpaullone inhibe la CDK2/cycline A,  
 la CDK2/cycline E, la CDK5/p25 et la GSK-3 $\alpha$ /GSK-3 $\beta$  (IC<sub>50</sub>  
 10 respectivement de 15, 200, 40 et 4nM).

. Autres paullones selon la formule I

Dans les tableaux 2A et 2B donnés ci-après et sur la figure 2, on a rapporté l'effet inhibiteur de paullones utilisées selon l'invention vis-à-vis de GSK-3 $\beta$ , CDK5/p25 et CDK1/cycline B.

TABLEAU 2A

Numéro	Composés	GSK3	CDK1	CDK5
98 N 215	<i>alsterpauillone</i> (9-Nitropauillone)	0.004 <sup>a</sup>	0.035 <sup>b</sup>	0.040 <sup>b</sup>
98 N 210	9-cyanopauillone	0.010 <sup>b</sup>	0.024 <sup>b</sup>	0.044 <sup>b</sup>
98 N 356	2,3-dimethoxy-9-nitropauillone	0.013 <sup>b</sup>	0.024 <sup>b</sup>	0.021 <sup>b</sup>
98 N 217	9-cyano-2,3-dimethoxypauillone	0.018 <sup>b</sup>	0.044 <sup>b</sup>	0.060 <sup>b</sup>
96 N 619	<i>kenpauillone</i> (9-Bromopauillone)	0.023 <sup>b</sup>	0.400 <sup>c</sup>	0.350 <sup>c</sup>
97 N 343	9-chloropauillone	0.024 <sup>b</sup>	0.600 <sup>c</sup>	0.300 <sup>c</sup>
97 N 487	9-trifluoromethylpauillone	0.030 <sup>b</sup>	0.400 <sup>c</sup>	0.600 <sup>c</sup>
98 N 357	3-(6-oxo-9-trifluoromethyl-5,6,7,12-tetrahydro-indolo[2-3-d][1]benzazepin-2-yl)-propionitrile (B)	0.033 <sup>b</sup>	0.047 <sup>b</sup>	0.033 <sup>b</sup>
98 N 002	2,3-dimethoxy-9-trifluoromethylpauillone	0.075 <sup>b</sup>	0.280 <sup>c</sup>	0.430 <sup>c</sup>
98 N 048	9-bromo-12-methylloxycarbonylmethylpauillone	0.075 <sup>b</sup>	1.400 <sup>d</sup>	350.000 <sup>e</sup>
97 N 353	9-fluoropauillone	0.080 <sup>b</sup>	1.600 <sup>d</sup>	1.300 <sup>d</sup>
97 N 608	9-bromo-2,3-dimethoxypauillone	0.100 <sup>c</sup>	0.200 <sup>c</sup>	0.500 <sup>c</sup>
97 N 483	9-bromo-2,3-dihydroxypauillone	0.120 <sup>c</sup>	3.000 <sup>d</sup>	3.000 <sup>d</sup>
97 N 352	9-methylpauillone	0.130 <sup>c</sup>	2.000 <sup>d</sup>	6.300 <sup>d</sup>
97 N 345	10-bromopauillone	0.140 <sup>c</sup>	1.300 <sup>d</sup>	2.700 <sup>d</sup>
97 N 318	2-bromopauillone	0.200 <sup>c</sup>	3.300 <sup>d</sup>	5.000 <sup>d</sup>
97 N 344	11-chloropauillone	0.200 <sup>c</sup>	1.400 <sup>d</sup>	2.900 <sup>d</sup>
98 N 351	2-(3-hydroxy-1-propenyl)-9-trifluoromethylpauillone (C)	0.200 <sup>c</sup>	0.300 <sup>c</sup>	2.000 <sup>d</sup>
98 N 354	2-bromo-9-nitropauillone	0.200 <sup>c</sup>	0.053 <sup>b</sup>	0.120 <sup>c</sup>
98 N 259	2-iodopauillone	0.250 <sup>c</sup>	3.700 <sup>d</sup>	7.400 <sup>d</sup>
98 N 051	9-bromo-12-(2-hydroxyethyl)-pauillone	0.300 <sup>c</sup>	3.000 <sup>d</sup>	140.000 <sup>e</sup>
98 N 211	9-bromo-12-methylpauillone	0.400 <sup>c</sup>	6.200 <sup>d</sup>	400.000 <sup>e</sup>
98 N 350	(E)-3-(6-oxo-9-trifluoromethyl-5,6,7,12-tetrahydro-indolo[2-3-d][1]benzazepin-2-yl)-acrylonitrile (E)	0.400 <sup>c</sup>	0.270 <sup>c</sup>	9.500 <sup>d</sup>
97 N 486	9-bromo-5-(methylloxycarbonylmethyl)pauillone	0.500 <sup>c</sup>	6.400 <sup>d</sup>	5.300 <sup>d</sup>
98 N 223	11-methylpauillone	0.500 <sup>c</sup>	3.000 <sup>d</sup>	9.000 <sup>d</sup>
97 N 317	<i>pauillone</i> (A)	0.620 <sup>c</sup>	7.000 <sup>d</sup>	10.100 <sup>c</sup>
98 N 225	11-ethylpauillone	0.700 <sup>c</sup>	3.800 <sup>d</sup>	23.000 <sup>c</sup>
98 N 216	9-bromo-7,12-dihydro-6-(hydroxyamino)-indolo[2-3-d][1]benzazepine (F)	0.750 <sup>c</sup>	1.000 <sup>d</sup>	2.100 <sup>d</sup>
97 N 609	2,9-dibromopauillone	0.800 <sup>c</sup>	0.300 <sup>c</sup>	10.000 <sup>c</sup>
97 N 347	11-bromopauillone	0.900 <sup>c</sup>	1.300 <sup>d</sup>	1.400 <sup>d</sup>
97 N 485	2,3-dimethoxypauillone	0.900 <sup>c</sup>	4.300 <sup>d</sup>	5.400 <sup>d</sup>
98 N 262	(E)-3-(6-oxo-9-trifluoromethyl-5,6,7,12-tetrahydro-indolo[2-3-d][1]benzazepin-2-yl)-acrylic acid methyl ester (D)	0.900 <sup>c</sup>	4.300 <sup>d</sup>	130.000 <sup>c</sup>
97 N 610	9-bromo-7,12-dihydro-6-methylthio-indolo[2-3-d][1]benzazepine (G)	1.200 <sup>d</sup>	43.000 <sup>c</sup>	450.000 <sup>c</sup>
98 N 358	(E)-2-(3-oxo-1-butenyl)-9-trifluoromethylpauillone (H)	1.400 <sup>d</sup>	0.320 <sup>c</sup>	34.000 <sup>c</sup>
98 N 213	9-bromo-12-ethylpauillone	1.500 <sup>d</sup>	23.000 <sup>c</sup>	260.000 <sup>c</sup>
97 N 612	9-bromo-7,12-dihydro-indolo[2-3-d][1]benzazepine-6(5H)-thione (I)	2.000 <sup>d</sup>	2.300 <sup>d</sup>	8.000 <sup>d</sup>
98 N 047	2-bromo-9-trifluoromethylpauillone	2.000 <sup>d</sup>	0.240 <sup>c</sup>	3.000 <sup>d</sup>
98 N 349	2-[2-(1-hydroxycyclohexyl)-ethynyl]-9-trifluoromethylpauillone (J)	2.000 <sup>d</sup>	3.200 <sup>d</sup>	8.300 <sup>d</sup>
97 N 613	9-bromo-5-methylpauillone	2.100 <sup>d</sup>	20.000 <sup>c</sup>	130.000 <sup>c</sup>
97 N 351	9-methoxypauillone	2.200 <sup>d</sup>	0.900 <sup>c</sup>	2.100 <sup>d</sup>
98 N 236	2-iodo-9-trifluoromethylpauillone	2.200 <sup>d</sup>	0.700 <sup>c</sup>	7.000 <sup>d</sup>
98 N 046	9-bromo-12-( <i>tert.</i> -butyloxycarbonyl)-pauillone	2.300 <sup>d</sup>	70.000 <sup>c</sup>	800.000 <sup>c</sup>
98 N 212	9-bromo-12-(2-propenyl)-pauillone	4.000 <sup>d</sup>	60.000 <sup>c</sup>	240.000 <sup>c</sup>
97 N 482	9-bromo-4-hydroxypauillone	4.300 <sup>d</sup>	40.000 <sup>c</sup>	850.000 <sup>c</sup>
98 N 049	8,10-dichloropauillone	5.000 <sup>d</sup>	2.500 <sup>d</sup>	350.000 <sup>c</sup>
98 N 001	5-benzyl-9-bromopauillone	10.000 <sup>c</sup>	35.000 <sup>c</sup>	270.000 <sup>c</sup>
97 N 607	9-bromo-4-methoxypauillone	16.000 <sup>c</sup>	250.000 <sup>c</sup>	400.000 <sup>c</sup>
98 N 224	9-bromo-5-ethylpauillone	24.000 <sup>c</sup>	470.000 <sup>c</sup>	300.000 <sup>c</sup>
98 N 209	9-bromo-5,7-bis-( <i>tert.</i> -butyloxycarbonyl)-pauillone	130.000 <sup>c</sup>	80.000 <sup>c</sup>	> 1000 <sup>c</sup>
97 N 484	4-methoxypauillone	140.000 <sup>c</sup>	430.000 <sup>c</sup>	1000.000 <sup>c</sup>
98 N 347	9-bromo-5,6,7,12-tetrahydro-benzo[6-7]cyclohept[1,2-b]indole (K)	180.000 <sup>c</sup>	51.000 <sup>c</sup>	360.000 <sup>c</sup>
98 N 214	2-phenyl-4-(2-thienyl)-5H-pyrido[2-3-d][1]benzazepine-6(7H)-thione (L)	350.000 <sup>c</sup>	33.000 <sup>c</sup>	700.000 <sup>c</sup>
98 N 208	9-bromo-5,7,12-tri-( <i>tert.</i> -butyloxycarbonyl)-pauillone	500.000 <sup>c</sup>	150.000 <sup>c</sup>	1000.000 <sup>c</sup>
97 N 611	9-bromo-5,12-bis-( <i>tert.</i> -butyloxycarbonyl)-pauillone	640.000 <sup>c</sup>	1000.000 <sup>c</sup>	> 1000 <sup>c</sup>
98 N 220	4-(4-chlorophenyl)-2-(2-naphthyl)-5H-pyrido[2-3-d][1]benzazepine-6(7H)-thione (M)	> 1000 <sup>c</sup>	> 1000 <sup>c</sup>	> 1000 <sup>c</sup>
98 N 348	5,6,7,12-tetrahydro-benzo[6-7]cyclohept[1,2-b]indole (N)	> 1000 <sup>c</sup>	130.000 <sup>c</sup>	> 1000 <sup>c</sup>

<sup>a</sup> < 0.01 µM; <sup>b</sup> 0.01–0.1 µM; <sup>c</sup> 0.1–1 µM; <sup>d</sup> 1–10 µM; <sup>e</sup> 10 µM.

Dans le tableau 2B, on indique également les IC50 pour GSK3, CDK1 et CDK5 pour d'autres dérivés de paullones utilisés selon l'invention. Les significations présentées par les substituants sont indiqués, pour chaque composé lorsqu'il ne s'agit pas d'un atome d'hydrogène.

Tableau 2B

Composés	GSK3	CDK1	CDK5
X = -SCH <sub>3</sub> ; R <sup>9</sup> = -Br	0,034	43,000	160,000
Y = résidu thiazolyle ; R <sup>9</sup> = -Br	0,120	0,600	4,000
R <sup>2</sup> = -CH = CH-CO-CH <sub>3</sub> ; R <sup>9</sup> = -CF <sub>3</sub>	0,350	4,300	15,000
R <sup>9</sup> = R <sup>11</sup> = -F	0,400	3,400	10,000
Y = thiazolyle ; R <sup>9</sup> = -Cl	0,400	0,500	5,000
Y = thiazolyle ; R <sup>9</sup> = -CH <sub>3</sub>	1,300	4,000	40,000
R <sup>2</sup> = R <sup>3</sup> = -OH	2,200	32,000	42,000
R <sup>2</sup> = -I ; R <sup>9</sup> = -Br	4,200	0,320	30,000
Z = pyridyle	5,500	2,200	3,300

Pour comparer les effets des composés actifs sur GSK-3 $\beta$  et les CDKs, on rapporte sur les figures 3A à 3C les valeurs de IC<sub>50</sub> vis-à-vis de chaque enzyme (CDK1/cycline B, CDK5/p25 et GSK-3 $\beta$ ) en fonction des valeurs de IC<sub>50</sub> vis-à-vis des 2 autres kinases.

Cette analyse montre que les efficacités des paullones vis-à-vis de CDK1 et CDK5 sont très liées, et le sont beaucoup moins vis-à-vis de GSK-3 $\beta$  et des CDKs.

10 Exemple 8 : Etude de l'inhibition par les paullones de GSK-3 $\beta$  par compétition avec l'ATP.

On rapporte sur la figure 4 les données cinétiques de détermination de l'activité de GSK-3 $\beta$  à différentes concentrations en alsterpaullone. Les activités enzymatiques sont décrites comme déterminé ci-dessus. Figure 4A : courbe primaire 1/V versés 1/ATP. Les concentrations en ATP dans ce mélange réactionnel varient de 0,5 à 4  $\mu$ M. La concentration en GS-1 est maintenue constante à 4  $\mu$ M. Dans l'encadré, on a représenté les pentes en fonction de la concentration à partir des courbes primaires. La constante d'inhibition apparente (K<sub>i</sub>) est indiquée par une flèche.

Les expériences de cinétique démontrent que l'alsterpaullone est également en compétition par rapport à l'ATP pour la liaison sur GSK-3 $\beta$ .

La constante d'inhibition apparente (k<sub>i</sub>) est de 20nM.

Exemple 9: Etude de l'inhibition par l'alsterpaullone de la phosphorylation de tau in vitro et in vivo par GSK-3 $\beta$ .

L'effet inhibiteur de l'alsterpaullone sur  
5 l'activité de la GSK-3 $\beta$  a été déterminé sur une protéine tau  
liant les microtubules. La protéine tau humaine recombinante  
exprimée dans des bactéries peut être phosphorylée in vitro  
par GSK-3 $\beta$  et cette phosphorylation est inhibée d'une manière  
dose-dépendante par l'alsterpaullone avec une IC<sub>50</sub> voisine de  
10 33nM.

On a rapporté sur la figure 5A les résultats de la  
résolution par SDS-PAGE, suivi d'une autoradiographie. Sur la  
figure 5B, on donne les résultats obtenus avec des cellules  
Sf9 exprimant htau23 (témoin non traité), ou exposées à  
15 l'alsterpaullone ou à l'aminopurvalanol pendant 3 h. Les  
lysats cellulaires (3  $\mu$ g htau23) sont résolus par SDS-PAGE,  
colorés au bleu de Coomassie ou soumis à un immunoblot avec  
différents anticorps : K9JA (anticorps pantau) qui reconnaît  
tau indépendamment de la phosphorylation, AT100, qui  
20 reconnaît tau phosphorylée sur Thr212 et Ser214, cette  
réaction étant très spécifique de la protéine tau  
d'Alzheimer, PHF-1 (phosphorylé sur Ser396/Ser-404, AT8  
(phosphorylé sur Ser202/Thr205), et AT180 (phosphorylé sur  
Thr231/Ser235).

25

Exemple 10 : Etude de l'inhibition de la phosphorylation de DARPP-32 par CDKS in vivo.

Le rôle de la protéine DARPP-32, en tant que  
30 substrat physiologique de CDKS/p25, a été récemment identifié  
par Bibble J.A. et al, (1999) Nature, 402, 669-671. Cette  
protéine devient un inhibiteur de PKA lorsqu'elle est  
phosphorylée sur Thr75 par CDK5/p25. In vivo, on n'observe  
pas de phosphorylation sur ce site dans les tissus p35<sup>-/-</sup>.

Pour déterminer la capacité inhibitrice de CDK5 dans le cerveau de l'alsterpaullone, on a traité des coupes de striatum (région du cerveau exprimant DARPP-32) avec différentes concentrations en alsterpaullone. Les coupes ont  
5 été incubées avec 0,1, 10 et 50  $\mu$ M d'alsterpaullone, pendant 60 mn. Le taux de phosphorylation de DARPP-32 sur Thr75 a été contrôlé par Western blot avec un anticorps phospho-spécifique et évalué par quantification des empreintes. Les résultats obtenus sont respectivement représentés sur les  
10 figures 5A et 5B. On constate que l'alsterpaullone est capable d'inhiber la phosphorylation de DARPP-32 *in situ*.

Exemple 11 : préparation d'une gélule en utilisant la 9-nitropauillone comme principe actif.

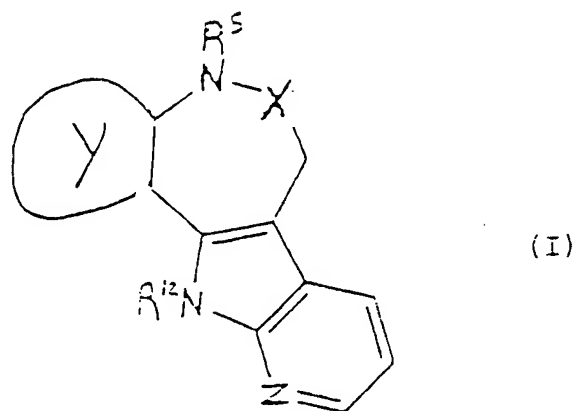
15

On mélange 20 mg de 9-nitropauillone avec les excipients classiquement utilisés pour la fabrication de gélules.



## REVENDICATIONS

1. Utilisation pour la fabrication de médicaments  
inhibiteurs de la GSX-3 $\beta$  de dérivés de paullones répondant  
5 à la formule générale (I) :



dans laquelle

- X représente un groupe C = O, C-S-CH<sub>3</sub>, C-S,  
-C-NHOH ;

- Z représente C ou N ;

- Y représente, avec le cycle adjacent, un résidu  
phényle ou thiazolyle ;

le ou les cycles constituant ces dérivés étant le cas  
échéant substitués par un ou plusieurs : atomes d'halogène,  
groupes hydroxy, alkylènehydroxy, alcynealkylènehydroxy,  
alcynehydroxycyclohexyle, alkyle, alkoxy, alkylènealkoxy,  
alkylènecyano, le groupe alkylène étant saturé ou insaturé,  
ces radicaux étant à chaîne droite ou ramifiée, en C1 à  
C18, ladite chaîne étant le cas échéant substituée par un  
ou plusieurs groupes hydroxy ou amino ; un ou plusieurs  
groupes trifluorométhyle ; -COM ; -COOM ; ou -CH<sub>2</sub>COOM

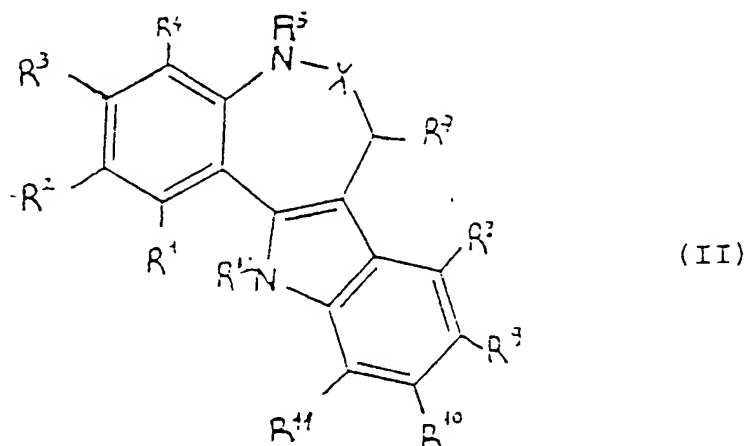
(avec M représentant un atome d'hydrogène, un groupe alkyle en C1 à C18, à chaîne droite ou ramifiée, substituée le cas échéant par un ou plusieurs groupes hydroxy et/ou amino) ; nitroso; nitro ; ou cyano ;

- R<sup>5</sup> représente un atome d'hydrogène ou un groupe alkyle en C<sub>1</sub> à C<sub>5</sub>,

- R<sup>12</sup> représente un atome d'hydrogène ou un groupe -C-CO<sub>2</sub>-(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub> ;

et les sels de ces dérivés physiologiquement acceptables.

2. Utilisation selon la revendication 1, caractérisée en ce que les dérivés de paullone répondent à la formule (II) :



dans laquelle,

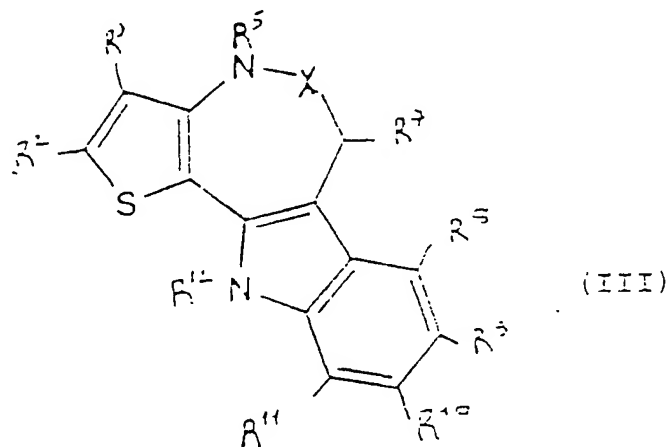
- X, R<sup>5</sup> et R<sup>12</sup> sont tels que définis dans la revendication 1, et

- R<sup>1</sup> à R<sup>4</sup>, R<sup>7</sup> à R<sup>11</sup>, identiques ou différents, représentent un atome d'hydrogène, d'halogène (F, Cl, Br, I), un groupe hydroxy, alkylènehydroxy, alcynealkylènehydroxy, alcynehydroxycyclohexyle, alkyle, alkoxy, alkylènealkoxy, alkylènecyano, ces radicaux étant à chaîne droite ou ramifiée, en C1 à C18, le groupe alkylène

étant saturé ou insaturé, ladite chaîne étant le cas échéant substituée par un ou plusieurs groupes hydroxy ou amino ; un groupe trifluorométhyle; un groupe -COM; -COOM; ou -CH<sub>2</sub>COOM, (avec M représentant un atome d'hydrogène, un  
 5 groupe alkyle en C1 à C18, à chaîne droite ou ramifiée, substituée le cas échéant par un ou plusieurs groupes hydroxy et/ou amino) ; un groupe nitroso; un groupe nitro ; ou un groupe cyano ;

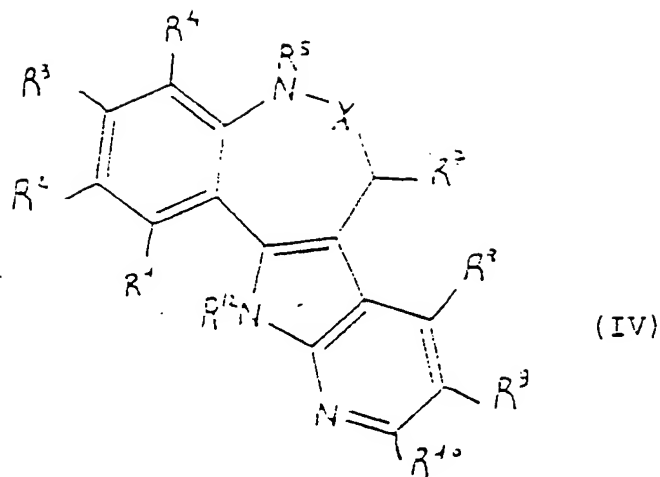
et les sels physiologiquement acceptables de ces  
 10 dérivés.

3. Utilisation selon la revendication 1, caractérisée en ce que les dérivés de paullone répondent à la formule (III),



dans laquelle les substituants présentent les  
 25 significations données dans la revendication 2 en rapport avec la formule (II).

4. Utilisation selon la revendication 1, caractérisée en ce que les dérivés de paullone répondent à la formule générale (IV):



dans laquelle les substituants présentent les significations données dans la revendication 2 en rapport avec la formule (II).

5. Utilisation selon l'une quelconque des revendications 2 à 4, caractérisée en ce que X représente C = O.

6. Utilisation selon l'une quelconque des revendications 2 à 4, caractérisée en ce que X représente C-S-CH<sub>3</sub> ou C-S.

7. Utilisation selon l'une quelconque des revendications 2 à 4, caractérisée en ce que X représente -C-NHOH.

8. Utilisation selon la revendication 2 ou 3, caractérisée en ce que les dérivés de paullone répondent aux formules (II) ou (III),

avec R<sup>9</sup> choisi parmi -NO<sub>2</sub>, -CN, -Cl, -Br, -CF<sub>3</sub>, alkyle en C1 à C5, en particulier méthyle, ou un atome d'hydrogène, R<sup>2</sup> et/ou R<sup>3</sup> choisis parmi alkoxy (en C<sub>1</sub> à C<sub>3</sub> pour le radical alkyle) et notamment méthoxy, alkylèncyano, vinylalkoxy, ou propylène, les autres substituants étant de l'hydrogène.

9. Utilisation selon la revendication 8, pour la fabrication de médicaments sélectivement inhibiteurs de GSK-3 $\beta$ , de CDK1 et de CDK5, de dérivés de paullones de formule (II), selon la revendication 2,

5 dans laquelle X = CO, R<sup>9</sup> est choisi parmi -NO<sub>2</sub>, -CN, -Br, -Cl, -CF<sub>3</sub>, H, et R<sup>2</sup> et/ou R<sup>3</sup> représentent H, alkoxy en C<sub>1</sub>-C<sub>5</sub>, notamment méthoxy, alkylènecyano, notamment méthylènecyano, les autres substituants étant de l'hydrogène.

10 10. Utilisation selon la revendication 9, caractérisée en ce que X = CO, R<sup>9</sup> représente -NO<sub>2</sub>, -CN, -Br, -Cl ou -CF<sub>3</sub>, les autres substituants représentant de l'hydrogène.

15 11. Utilisation selon la revendication 9, caractérisée en ce que X=CO, R<sup>9</sup> présente les significations ci-dessus et R<sup>2</sup> et R<sup>3</sup> représentent tous deux un groupe alcoxy en C<sub>1</sub> à C<sub>5</sub>, notamment méthoxy, ou R<sup>2</sup> représente un groupe alkylènecyano, notamment éthylènecyano.

20 12. Utilisation selon la revendication 6, caractérisée en ce que R<sup>9</sup> est tel que défini dans l'une quelconque des revendications 8 à 11, et représente en particulier un atome d'halogène, notamment de brome.

25 13. Utilisation pour la fabrication de médicaments inhibiteurs de GSK-3 $\beta$ , de CDK1 et de CDK5, de la 9 -nitro-7,12-dihydroindolo[3,2-d] [1]-benzazépin-6 (5H)-one.

30 14. Utilisation pour la fabrication de médicaments sélectivement inhibiteurs de GSK-3 $\beta$ , de paullones de formule (II) selon la revendication 2, dans laquelle X = SCH<sub>3</sub>, et R<sup>9</sup> est tel que défini dans l'une

quelconque des revendications 8 à 11, et représente en particulier un atome d'halogène, notamment de brome.

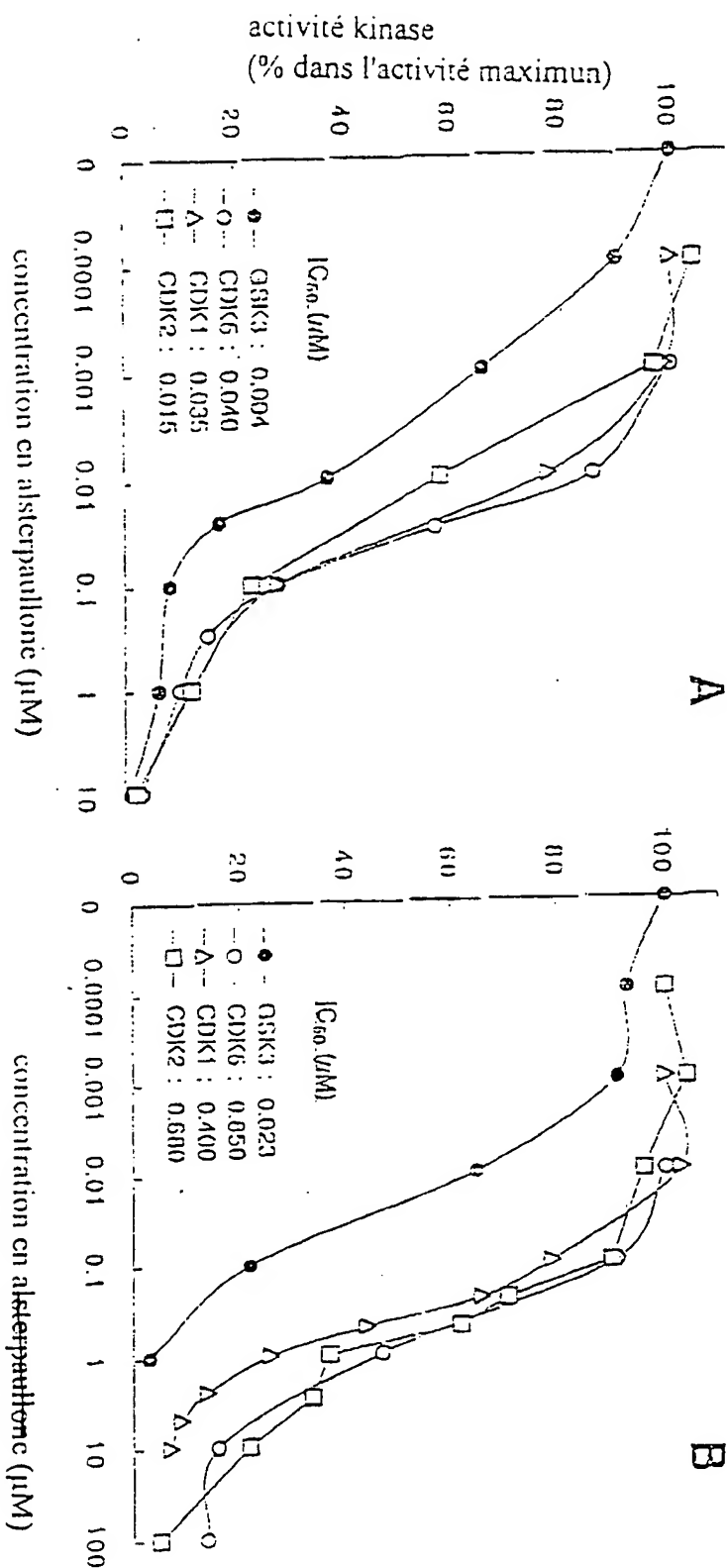
15. Utilisation pour la fabrication de médicaments inhibiteurs de GSK-3 $\beta$ , CDK1 et CDK5, avec une sélectivité plus grande vis-à-vis de GSK-3 $\beta$  et de CDK1, des dérivés de paullones de formule (III) selon la revendication 3, dans laquelle R<sub>3</sub> est tel que défini dans l'une quelconque des revendications 8 à 11, les autres substituants représentant un atome d'hydrogène.

10 16. Utilisation selon l'une quelconque des revendications 1 à 15, caractérisée en ce que les médicaments sont préparés pour une administration par voie orale, sous forme de gélules, comprimés, dragées ou capsules.

15 17. Utilisation selon l'une quelconque des revendications 1 à 15, caractérisée en ce que les médicaments sont préparés pour une administration par voie injectable, sous forme de solution.

20 18. Utilisation selon l'une quelconque des revendications 1 à 15, pour le traitement de pathologies impliquant GSK-3 $\beta$  et CDK5.

19. En tant que nouveau composé la 9-cyano-2,3-diméthoxypaullone.



alsterpaullone  
Figure 1

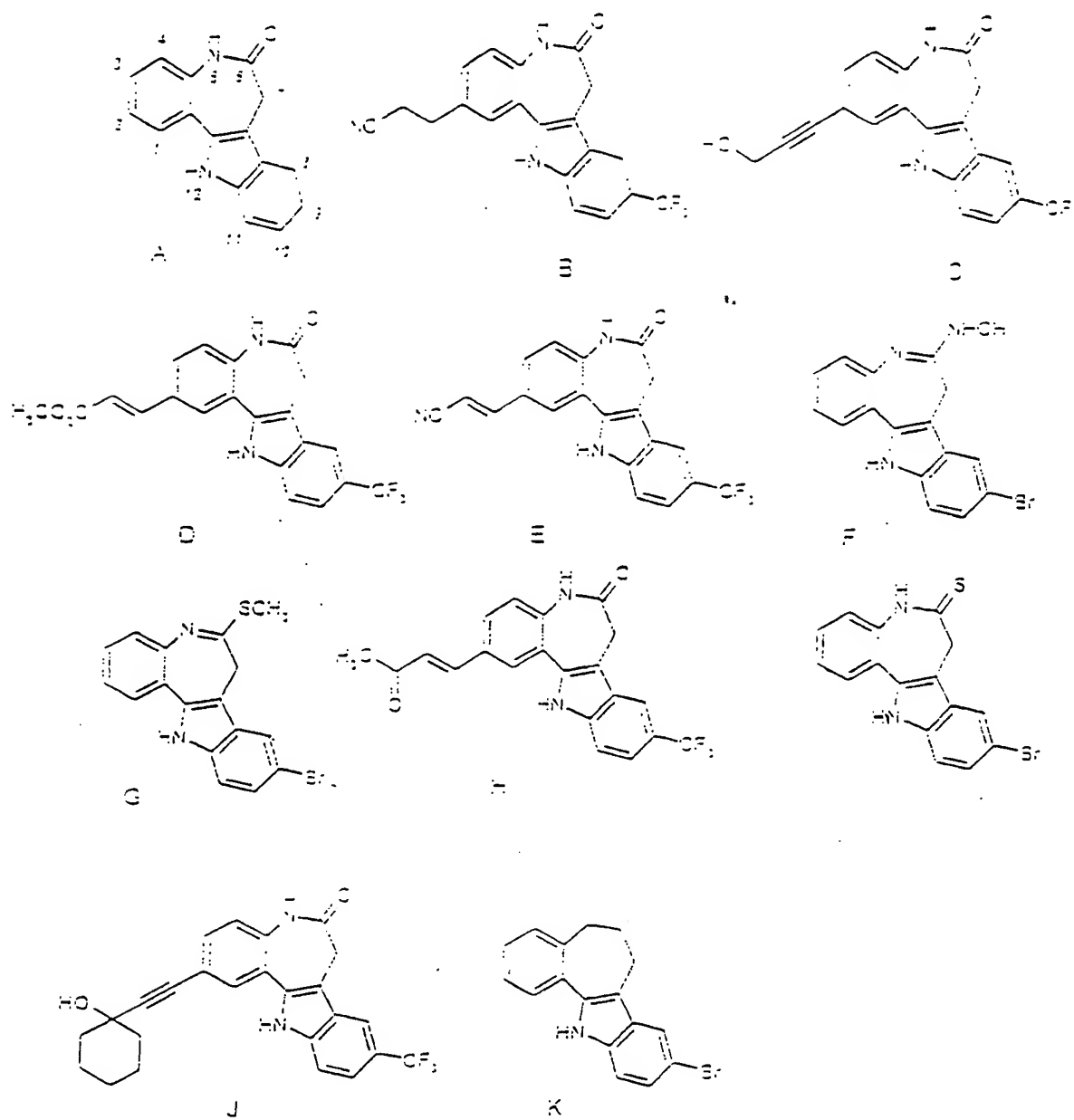


Figure 2



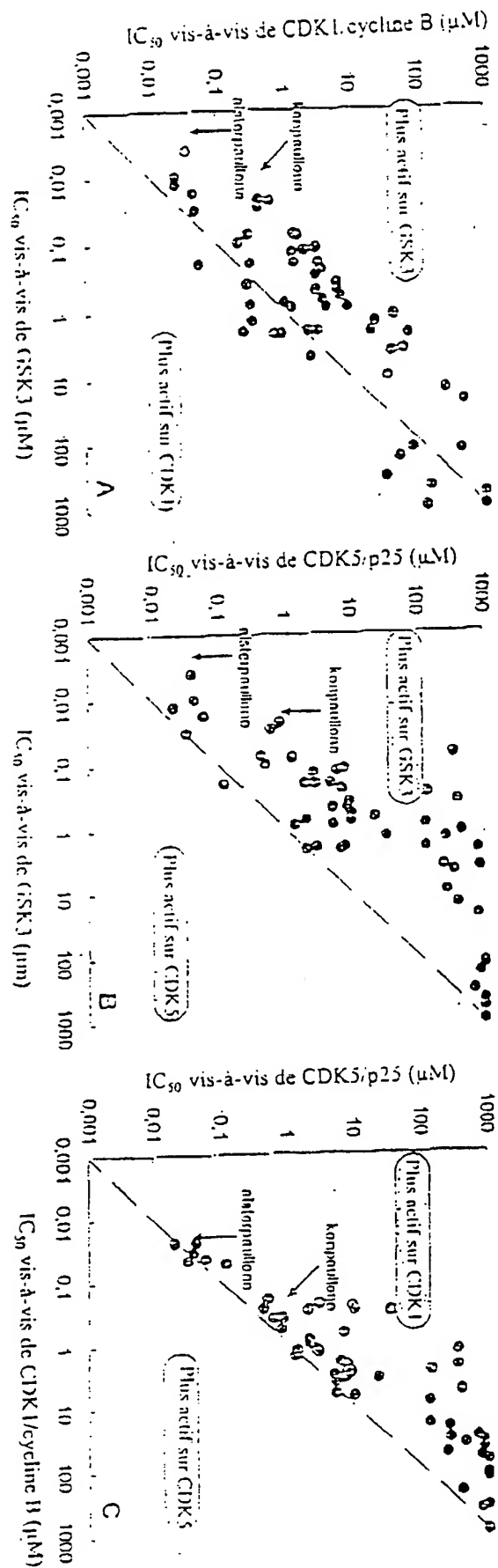


Figure 3

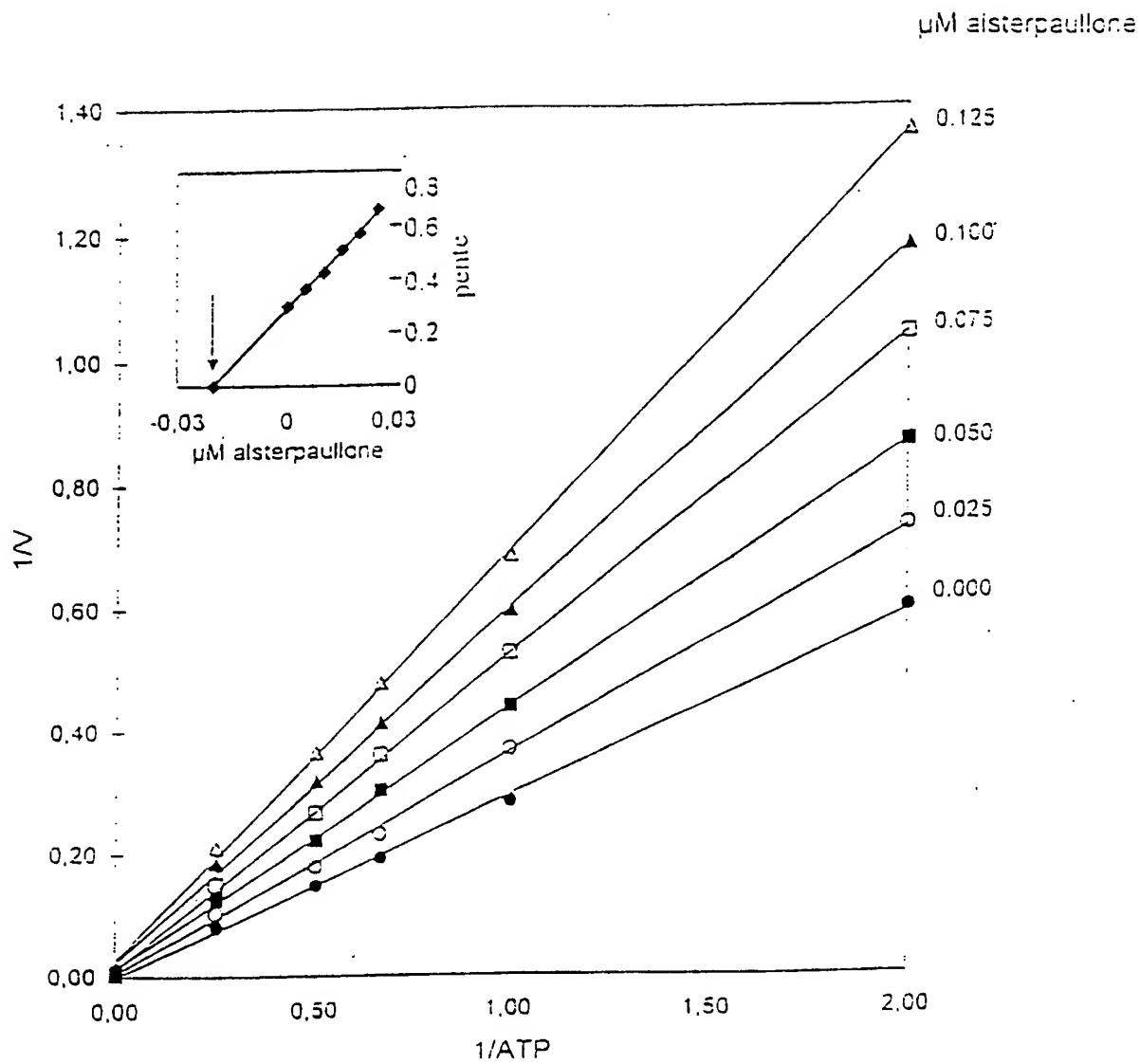


Figure 4

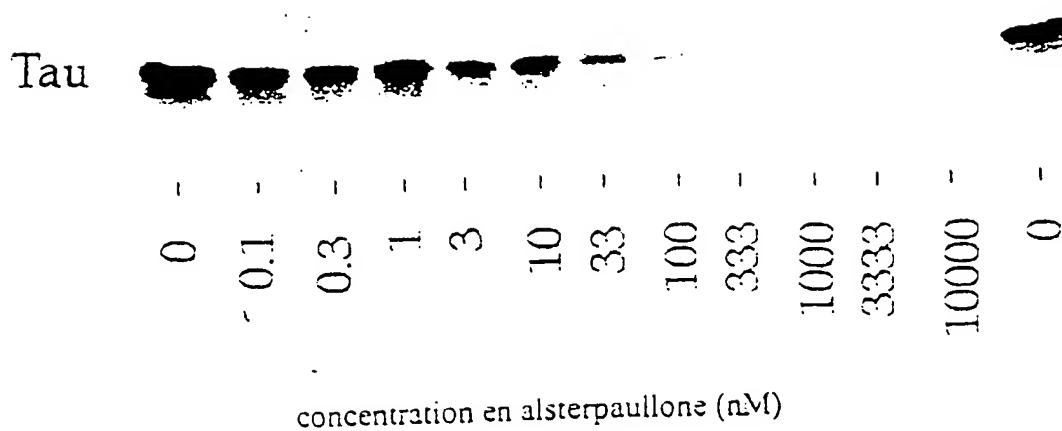


Figure 5A

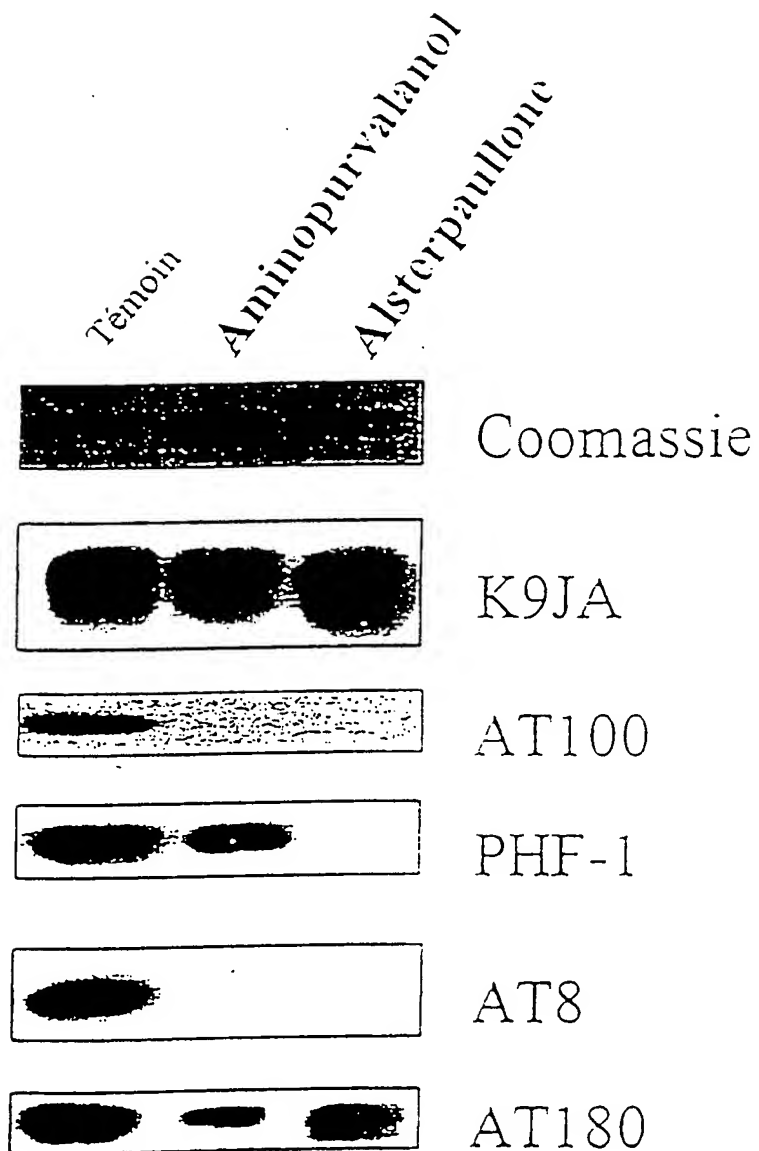


Figure 5B

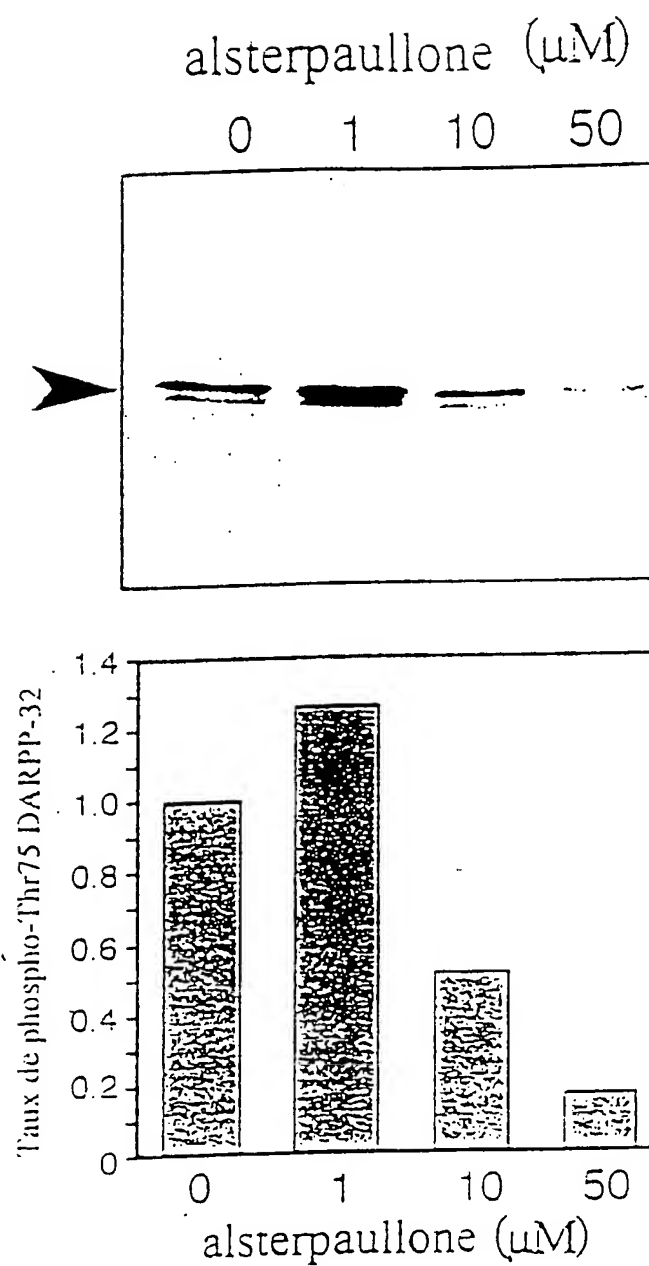


Figure 6

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 A61K31/55 A61P35/00 A61P9/00 A61P25/28 C07D487/04  
 //(C07D487/04, 223:00, 209:00)

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 C07D A61K A61P

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

CHEM ABS Data, WPI Data, EPO-Internal

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 99 65910 A (UNITED STATES OF AMERICA, DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES, USA) 23 December 1999 (1999-12-23) page 5, line 6 - line 25	1
Y	WO 99 21859 A (GLAXO GROUP LTD) 6 May 1999 (1999-05-06) claim 26	1

☐ Further documents are listed in the continuation of box C.



Patent family members are listed in annex.

## \* Special categories of cited documents :

- \*A\* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- \*E\* earlier document but published on or after the international filing date
- \*L\* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- \*O\* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- \*P\* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- \*T\* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- \*X\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- \*Y\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- \*G\* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

8 June 2001

Date of mailing of the international search report

18/06/2001

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
 NL - 2280 HV Rijswijk  
 Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
 Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Alfaro Faus, I

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)		Publication date
W0 9965910	A	23-12-1999	AU	4571499 A	05-01-2000
			EP	1086105 A	28-03-2001
<hr/>					
W0 9921859	A	06-05-1999	AU	1151099 A	17-05-1999
<hr/>					

## A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE

CIB 7 A61K31/55 A61P35/00 A61P9/00 A61P25/28 C07D487/04  
 //(C07D487/04,223:00,209:00)

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

## B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)

CIB 7 C07D A61K A61P

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si réalisable, termes de recherche utilisés)

CHEM ABS Data, WPI Data, EPO-Internal

## C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
Y	WO 99 65910 A (UNITED STATES OF AMERICA, DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES, USA) 23 décembre 1999 (1999-12-23) page 5, ligne 6 - ligne 25 ---	1
Y	WO 99 21859 A (GLAXO GROUP LTD) 6 mai 1999 (1999-05-06) revendication 26 -----	1

☐ Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

☒ Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

## \* Catégories spéciales de documents cités:

\*A\* document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent

\*E\* document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date

\*L\* document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)

\*O\* document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens

\*P\* document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

\*T\* document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention

\*X\* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément

\*Y\* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier

\*Z\* document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

8 juin 2001

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

18/06/2001

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale

Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2  
 NL - 2280 HV Rijswijk  
 Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
 Fax: (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Alfaro Faus, I



Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
WO 9965910 A	23-12-1999	AU 4571499 A EP 1086105 A	05-01-2000 28-03-2001
WO 9921859 A	06-05-1999	AU 1151099 A	17-05-1999